

Partial Translation of
JP 10(1998)-313893 A

Publication Date : December 2, 1998

5 Application No. : 9(1997)-143510

Application Date : May 16, 1997

Applicant : KYOTO DAIICHI KAGAKU CO., LTD.

Inventor(s) : Katsutaka OISHI

10 Title of the Invention :

MEASUREMENT OF GLYCATED PROTEIN

Translation of claims

[Claim 1] A method for measuring a glycated protein in a sample
15 using a fructosyl amino acid oxidase,
wherein the sample contains EDTA.

[Claim 2] The method according to claim 1, wherein a bacterial
strain from which the fructosyl amino acid oxidase is derived is *Fusarium*
oxysporum S-1F4 (FERM BP-5010).

20

Translation of paragraph [0017]

[0017]

The measurement was carried out in the following manner. First,
EDTA and a fructosyl amino acid oxidase shown below were added and
25 mixed, and thereafter, the mixture was incubated at 37°C for 10 minutes.

10 mM EDTA · 2Na 100 µl

6 U/ml FAOD-S 10 µl

Then, a color developing solution containing the following substrate
solution was further added.

30 10 mM glycated N^α-Z-lysine 100 µl

3 mM 4-aminoantipyrine 30 µl

3 mM N-ethyl-N-(2-hydroxyl-3
-sulfoethyl)-3-methylalanine 30 µl

60U/ml peroxidase 30 µl


35 0.1M Tris hydrochloric acid buffer solution (pH 8) 500 µl

The resultant mixture was incubated at 37°C for 30 minutes. Thereafter, the absorbance of the mixture was measured at 555 nm. Furthermore, a control that contains the same amount of water instead of EDTA · 2Na was prepared. With regard to this control, the measurement
5 was carried out in the same manner as in the above to compare the extent of an influence of EDTA · 2Na. Moreover, the same measurement was carried out with regard to a fructosyl amino acid oxidase derived from the genus *Gibberella* (hereinafter referred to as FAOD-G) that had been known as an enzyme affected by the EDTA · 2Na.

10

MEASUREMENT OF SACCHARIFIED PROTEIN

Patent number: JP10313893
Publication date: 1998-12-02
Inventor: OISHI KATSUTAKA
Applicant: KDK CORP
Classification:
- international: C12Q1/26
- european:
Application number: JP19970143510 19970516
Priority number(s):

Also published as: JP10313893 (A)**Abstract of JP10313893**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for measuring a saccharified protein, comprising using an enzyme not causing inhibition of reaction even if EDT is included in a specimen when a saccharified protein in a biological sample is measured by fructosylamino acid oxidase.

SOLUTION: Fructosylamino acid oxidase which is produced by *Fusarium oxysporum* S-1F4 (FERM BP-5010) is separated and purified and the purified oxidase is used for measuring saccharified proteins. Thereby, a saccharified protein can be measured without causing reaction inhibition even if EDT is included in a specimen.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-313893

(43)公開日 平成10年(1998)12月2日

(51)Int.Cl.⁶

C 1 2 Q 1/26

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/26

審査請求 未請求 請求項の数2 F D (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平9-143510

(22)出願日 平成9年(1997)5月16日

(71)出願人 000141897

株式会社京都第一科学

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72)発明者 大石 勝隆

京都市南区東九条西明田町57 株式会社京都第一科学内

(54)【発明の名称】 糖化たんぱく質の測定方法

(57)【要約】

【課題】 生体試料中の糖化たんぱく質をフルクトシルアミノ酸オキシダーゼによって測定する場合に、EDTAを含有する検体であっても反応阻害が起こらない酵素を用いる糖化たんぱく質の測定方法が望まれていた。

【解決手段】 菌がフサリウム・オキシスポラムS-1 F4 (Fusarium oxysporum S-1 F4) (FERM BP-5010) が生成するフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを分離精製して用いることによってEDTAを含有する検体であっても反応阻害が起こらない糖化たんぱく質の測定方法を確立することができた。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中の糖化たんぱく質をフルクトシルアミノ酸オキシダーゼによって測定する場合において、該試料がEDTAを含有する検体を用いて測定する事を特徴とする糖化たんぱく質の測定方法。

【請求項2】 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを生成する菌がフサリウム・オキシスポラムS-1F4 (*Fusarium oxysporum* S-1F4) (FERMBP-5010)である請求項1に記載する糖化たんぱく質の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、糖化たんぱく質をフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いた酵素法によって測定する糖化たんぱく質の測定方法に関する。更に詳しくは血液検体がEDTAを添加した採血管に採取され、検体中にEDTAが含有される場合であっても、反応阻害を受けずに糖化たんぱく質の測定を行うことができるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いた測定方法に関する発明である。

【0002】

【従来の技術】糖化たんぱく質は、たんぱく質を構成するアミノ酸のアミノ基と、アルドース等の還元糖のアルデヒド基が非酵素的に且つ不可逆的に結合して生成される物質であり、この非酵素的且つ不可逆的な結合をアマドリ転移と呼ぶことからアマドリ化合物とも言われている。糖化たんぱく質の生成速度は、たんぱく質と還元糖の濃度、時間、温度に依存しており、還元糖の量が多い程、たんぱく質と還元糖の接触時間が長い程、たんぱく質の変性が起きない程度で温度が高い程、糖化たんぱく質の生成速度は早くなり、生成量が多くなる。生体中では糖化されるたんぱく質の半減期によって糖化たんぱく質の濃度が異なるため、糖化たんぱく質の濃度を測定することによって、様々な情報を入手することができる。例えば、赤血球中のヘモグロビンが糖化された糖化ヘモグロビンや血漿中のアルブミンが糖化された糖化アルブミンの濃度値は、過去の一定期間における平均血糖値を反映しているため、健康診断におけるスクリーニング検査や糖尿病の診断及び治療の指標として有用されている。

【0003】糖化たんぱく質の測定方法としての従来法には、高速液体クロマトグラフィを利用する方法 [Chromatogr. Sci. 10:659(1979)]、ホウ酸を結合させた担体をつめたカラムを用いる方法 [Clin. Chem. 28:2088(1982)]、電気泳動 [Clin. Chem. 26:1598(1980)]、抗原抗体反応を利用する方法 [JJCLA 18:620(1993)、機器・試薬16:33-37(1993)]、などが知られているが、高価な専用機器が必要であったり、測定結果の正確性又は多数の検体を処理しなければならないといった迅速性に問題があった。

【0004】従来技術の抱える問題点を解決した方法として、糖化たんぱく質にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを反応させ、酵素反応によって生成する過酸化水素又は消費する酸素量を測定することで、糖化たんぱく質を定量する方法がある。(特公平5-33997号公報) また、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いて糖化たんぱく質をプロテアーゼによってアミノ酸またはペプチドまでに消化断片化させた後、糖化たんぱく質を定量する方法がある。(特開平5-192193号公報) これら従来から用いられている酵素は、生体試料として採取する時の状態、例えば抗凝固剤が及ぼす影響までは詳しく調べられていなかった。臨床検査において測定に用いる生体試料として血液検体は、採血管によって採取される。採血管は検査項目により異なるが、血清が必要な場合は、凝固促進剤が添加された採血管を用い、血漿が必要な場合は、抗凝固剤としてヘパリンが添加された採血管が用いられる。血糖検査の場合は、ヘパリン、EDTA (EDTA・2Na、EDTA・2K)、フッ化ナトリウム等が単独又は複数添加されている採血管が用いられるため、血液検体は数%ではあるが添加物が含有することになる。そして検査によっては添加物が測定に大きな影響を与えるため問題になる場合が多い。また場合によっては他の検査に採血管を流用して行うこともあり、血液検査で用いられるEDTA添加採血管を糖化ヘモグロビンの検査に用いる場合もある。よって採血管の種類に関わらず測定できる事が望ましい。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】生体試料中の糖化たんぱく質をフルクトシルアミノ酸オキシダーゼによって測定する場合に、EDTAを含有する検体であっても反応阻害が起こらない酵素を用いる糖化たんぱく質の測定方法が望まれていた。現在は臨床検査における測定装置は全自動化が進み、測定者は検体をセットするだけで検体のサンプリングから測定結果を得るまでが非常に簡単になった。更に最近では測定装置を検体搬送ラインでつないで迅速且つ省力化されている。このような最新システムにも適応できる様に用いられる採血管による影響を受けない測定方法が必要となる。本発明にある、糖化たんぱく質をフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いた酵素法によって測定する糖化たんぱく質の測定方法とは、糖化たんぱく質をプロテアーゼでアミノ酸、ペプチドまでに消化断片化したものをフルクトシルアミノ酸オキシダーゼで測定する事を言い、プロテアーゼ処理することは本発明における分野では公知である。

【0006】

【課題を解決するための手段】糖化たんぱく質に特異的に作用し、且つ通常採血管で使用される含有量の範囲内でEDTAによる反応阻害の起こらないフルクトシルアミノ酸オキシダーゼは、フサリウム属の菌を、フルクトシルリジン又はフルクトシルN^α-Z-リジン (以下F

ZLと記す。)添加培地から精製分離することによって見いだす事ができた。EDTAによるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの反応阻害を測定するため、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの基質としてFZLを用いた。反応はフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとEDTAを予め混合させた後に基質を添加して、酵素反応によって生成する過酸化水素量を比色法により吸光度を測定した。EDTAを添加した時の吸光度値と添加しない時の吸光度値を用いて阻害の影響の程度を比較した。

【0007】フルクトシルリジン及びFZL含有培地は、グルコースとリジン又はN^α-Z-リジンとを100～150℃の温度で3～60分間高温加圧することで得ることができる。フルクトシルリジン及びFZL含有培地を用いて菌の培養を行うことにより、菌が生産するフルクトシルアミノ酸オキシダーゼはフルクトシルリジン及びFZLに特異性の高い酵素を得ることができる。

【0008】フルクトシルリジン及びFZL含有培地を用いて土壤中の微生物をスクリーニングしたところフサリウム属の菌として、フサリウム・オキシスポラムS-1F4 (*Fusarium oxysporum* S-1F4) (FERM BP-5010)を得ることができた。

【0009】フルクトシルリジン又はFZLの作製方法を以下に述べる。グルコース0.01～50重量%とリジン又はN^α-Z-リジンを0.01～20重量%を含む水溶液を作製して、100～150℃の温度において3～60分間高温加圧処理することによって0.01～0.5%のフルクトシルリジン又はFZLを得ることができる。好ましくはグルコース200g、リジン又はN^α-Z-リジン10gを1000mlの水溶液として、120℃、20分間高温加圧処理する。続いて逆相クロマトグラフィ又はイオン交換クロマトグラフィで精製することによりフルクトシルリジン又はFZLを得ることができる。フルクトシルリジン又はFZL含有培地は、精製したフルクトシルリジン又はFZLを培地に添加することによって得られる。

【0010】フルクトシルリジン又はFZLを添加する培地としては、炭素源、窒素源、無機物、その他栄養源を含有する通常の培地を用いることができる。炭素源としては、グルコース、キシロース、グリセリン等、窒素源としては、ペプトン、カゼイン消化物、酵母エキスを含有することができる。無機物としてはナトリウム、カリウム、カルシウム、マンガン、マグネシウム、コバルト等通常の培地に含有されるものを用いることができる。培養は25～37℃であって、好ましくは28℃で培養されるのが良い。培地のpHは4.0～8.0の範囲内であって、好ましくは5.5～6.0である。フサリウム・オキシスポラムS-1F4を同条件下で20～40時間、好ましくは24時間培養すると、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを得ることができるが、24時間による培養が最も効率の良い培養時間である。この様

にして得られた培養物は核酸や細胞壁を除去して酵素の精製品を得ることが可能である。通常、酵素は菌体内に蓄積されるので、培養物中の菌を破碎し、酵素を抽出する。菌細胞の破碎は、物理的手段又は溶媒を利用した溶解手段、凍結処理、超音波処理、加圧などの方法がある。酵素の分離精製法は硫酸等による塩析、エタノール等の有機溶媒による沈殿、イオン交換クロマトグラフィやゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィなどを適宜組み合わせで行う。例えば、培養物を遠心又は吸引ろ過して菌糸体を集め洗浄後、0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.5)に懸濁し、ダイノミルによって菌糸体を破碎する。次いで、遠心分離した上清を硫酸分画、DEAE-セファセルイオン交換クロマトグラフィで処理することにより精製する。この様に培養液から分離して精製された酵素をFAOD-Sと呼称して以下説明を続ける。

【0011】フサリウム・オキシスポラムS-1F4によって生成される酵素は下記の特性を有する。酵素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 α -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒し；安定pH4.0～12.0、至適pHは8.0であり；安定温度は約20～55℃、至適温度は45℃であり；セファクリルS-200カラムを用いたゲルろ過法で測定した場合、分子量は約45000(45kDa)である。

【0012】本発明のFAOD-Sを生成する菌である、フサリウム・オキシスポラムS-1F4は本発明者らが土壤中より単離したものであり、菌学的特性は以下の通りである。菌の分類はブース著「ザ・ジーナス・フサリウム(The Genus *Fusarium*)」(CMI.1971)の記述に準拠した。

培地における生育状況

PDA培地、ポテト・シュクロース寒天培地、オートミール培地における生育はいずれの培地でも非常に良好であった。25℃で7日間の培養によって、菌体はフェルト状に培養容器全体に広がって白色ないし薄い紫色を呈する。

分類学的性質

分離した菌の同定は、微生物をオートミール培地で培養し、分生子(conidia)や(conidiophor)などの顕微鏡下の形態観察から行った。その結果、コロニーの色は白色ないし薄い紫色であり、マイクロコニディア(microconidia)とマクロコニディア(macroconidia)及び厚膜胞子を多数形成する。マクロコニディアの形状が三日月型であり、3～5の隔壁を有していること、マイクロコニディアの形状が卵型ないし長円系形であり、小型分生胞子を擬頭状に形成することから、フサリウム・オキシスポラム(*Fusarium oxysporum*)と同定された。本菌は、工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERM BP-5010(寄託日：平成6年2月24日)の下で

寄託されている。

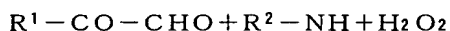
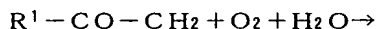
【0013】フサリウム・オキシスポラムS-1F4が生成したFAOD-Sの特性を詳細に説明する。

一般的な誘導特性

FAOD-Sはフルクトシルリジン又はFZLによって誘導される誘導酵素であり、フルクトシルリジン又はFZLの存在下でフサリウム・オキシスポラムS-1F4を培養することにより得ることができる。FAOD-Sは、グルコースとリジン又はグルコースとN^α-Z-リジンを別個に調製した培地によっては酵素を誘導することが出来ない。

【0014】反応特異性及び基質特異性

FAOD-Sは、



(式中、R¹はアルドース残基、R²はタンパク質残基を表す)で示される反応における触媒作用をする。本発明によるFAOD-Sは、上述した反応を示し特にフルクトシルリジン又はFZLに対して高い特異性を示した。精製酵素は、フサリウム・オキシスポラムS-1F4を24時間培養した後、培養物を吸引ろ過して菌糸体を集めて洗浄した後、0.1M Tris-HCl緩衝液(pH 8.5)に懸濁させダイノミルにより菌糸体を破碎し、上清を硫酸分画、DEAE-セファセルイオン交換クロマトグラフィで精製した。

【0015】pH及び温度の条件

10mM	EDTA・2Na	100μl
6U/ml	FAOD-S	10μl

次に下記に示した基質溶液を含む発色溶液を添加して、

10mM	糖化N ^α -Z-リジン	100μl
3mM	4-アミノアンチピリン	30μl
3mM	N-エチル-N-(2-ヒドロキシー-3-スルホプロピル)-3-メチルアラニン	30μl
60U/ml	ペルオキシダーゼ	30μl
0.1M	トリス-塩酸緩衝液(pH8)	500μl

これらを混合して37℃で30分間インキュベーションを行った後、555nmにおける吸光度を測定した。EDTA・2Naの代わりに水を同量添加した対照サンプルを用意して同様に測定を行いEDTA・2Naの影響の程度を比較した。また、EDTA・2Naに阻害を受けることが分かっているジベレラ属由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ(以下FAOD-Gと記す)についても同様に測定を行った。

【0018】EDTAの代わりに水を添加した時の吸光度は、1.75であった。この数値を参考にして各FAODのEDTAによる影響を見てみると、FAOD-Sの吸光度は1.78で全く影響が見られなかったが、FAOD-Gでは吸光度が1.05で酵素反応がEDTA

* pH条件の測定

0.1M酢酸、リン酸カルシウム(K-P)、Tris-HCl及びグリシン-NaOH緩衝液(pH4.0~12.0)にFAOD-Sを加え30℃10分間インキュベートした後、通常の条件(30℃、pH8.0)で活性を測定した。

温度条件の測定

0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)中で25~60℃の温度条件にFAOD-Sを加え、10分間インキュベートした後、通常の条件で活性を測定した。上述した方法によって測定を行った結果、FAOD-Sの安定なpH域は、pH4.0~12.0であって好ましくは8.0である。また、安定な温度域は20~55℃であり、30℃以上で徐々に失活する。また、酵素反応は30~50℃、好ましくは40~50℃、より好ましくは45℃で効率良く進行する。

【0016】

【発明の実施の形態】上述した方法によって得られた酵素を用いて、解糖阻止剤としてEDTAが及ぼす影響の程度を確認した。EDTA・2Naの溶液を作製し、基質としてFZLを用いてフルクトシルアミノ酸オキシダーゼによって発生する過酸化水素をペルオキシダーゼによる定量法を用いて測定を行った。

【0017】測定は、まず下記のEDTAおよびフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを添加して混合した後37℃で10分間インキュベーションを行う。

によって40%も阻害されていることが分かった。このことからFAOD-SはEDTA・2Naによって阻害を受けないことが判明した。

【0019】

【発明の効果】本発明によれば、フサリウム・オキシスポラム由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いることにより、検体に抗凝固剤としてEDTAが含有されていても酵素反応が阻害を受けずに糖化たんぱく質を正確に測定することが可能となった。

【0020】

【図面の簡単な説明】

【図1】FAOD-SおよびFAOD-GのEDTAによる影響を示す。

【手続補正書】

【提出日】平成9年7月4日

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全面

【補正方法】追加

【補正内容】

【図1】

